PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46245 C07K 14/47, C12N 15/12 A2 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/00776

(22) Internationales Anmeldedatum: 1. Februar 2000 (01.02.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 05 128.3 199 49 436.3

1. Februar 1999 (01.02.99) DE

8. Oktober 1999 (08.10.99) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHER-ING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CHRISTOPHERS, Enno [DE/DE]; Schlossgarten 12, D-24105 Kiel (DE). HARDER, Jürgen [DE/DE]; Esmarchstrasse 55, D-24105 Kiel (DE). SCHRÖDER, Jens [DE/DE]; Kleiner Bornkrug 7, D-24241 Blumenthal (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: HUMAN ANTIBIOTIC PROTEINS

(54) Bezeichnung: HUMANE ANTIBIOTISCHE PROTEINE

(57) Abstract

The invention relates to proteins, notably SAP-2 and SAP-3, having an antibiotic action. The invention also relates to a method for purifying certain antimicrobial proteins, as well as to a use of said antimicrobial proteins for antibiotic therapy or to a use of cells which were transfected with a DNA which codes for the proteins provided for in the invention.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Proteine, die antibiotisch wirksam sind. Es handelt sich um SAP-2 und SAP-3. Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten antimikrobiellen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der antimikrobiellen Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die erfindungsgemässen Proteine kodiert.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenica	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italico	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamenin		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
Cυ	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	и	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

15

20

Humane antibiotische Proteine

Die Erfindung betrifft Proteine / Peptide (Proteine), die antibiotisch wirksam sind. Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten antibiotischen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die antibiotischen Proteine kodiert.

STAND DER TECHNIK:

Pathogene Mikroorganismen befinden sich gewöhnlich auf der Oberfläche von Epithelien. Dort haften sie an und vermehren sich. Gelegentlich dringen sie auch in tiefere Gewebsschichten ein. Da die Immunantwort gegen diese pathogenen Mikroorganismen langsam einsetzt, ist es nicht verwunderlich, daß die Epithelzellen über eine Abwehr verfügen, mit Hilfe von sezernierten antimikrobiellen Substanzen gegen die Mikroorganismen vorzugehen. Einige dieser Substanzen führen zu einer Mangelernährung bei den Mikroorganismen, andere töten die Mikroorganismen ab, indem Strukturen der Mikroorganismen zerstört werden.

Die Epithelien von Säugern sind normaler Weise nicht infiziert. Dennoch ist die Hautoberfläche von Bakterien und Pilzen dicht besiedelt. Es handelt sich dabei um haut - spezifische Mikroorganismen, die, wenn sie unter Kontrolle stehen, nicht pathogen sind.

- Das erste bekannte, epitheliale β Defensin, das die Luftröhre der Rinder schützt, ist TAP, welches 64 Aminosäuren besitzt. (D.G. ZASLOFF et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, p 3952 3956). Dieses TAP vom Rind wirkt anti bakteriell gegen *E. coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* bei einer minimalen Inhibitionskonzentration von 12 50 µg/ml. Auch *Candida albicans* wird zerstört. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches gewebespezifisch exprimiert wird.
 - Ein weiteres β Defensin schützt die Zunge von Rindern, nämlich LAP, welches eine hohe Homologie zu TAP aufweist. (B.S. SCHONWETTER et al. (1995) Science Vol. 267, p 1645 1648)
- Erst 1995 wurde das erste humane β Defensin gefunden, welches hBD-1 genannt wird. (K.W. BENSCH et al. (1995) FEBS Lett, Vol. 368, p 331 335) So besitzt hBD-1 eine anti bakterielle Wirkung gegen Gram negative Bakterien bei einer Konzentration von 60 bis 500 µg/ml. (M. GOLDMAN et al. (1997) Cell.

Vol. 88, p 553 – 560) hBD-1 wird dominant in den Nieren exprimiert, jedoch auch andere epitheliale Gewebe sekretieren hBD-1.

Unabhängig von diesen Untersuchungen war von Interesse, was die Haut normalerweise gesund hält und warum die Haut selten infiziert wird. Das zweite beim Menschen isolierte β - Defensin war das hBD-2, das aus 41 Aminosäuren besteht. (J. HARDER et al. (1997) Nature, Vol. 387, p 861) hBD-2 wirkte sehr effektiv gegen Gram – negative Baktenen mit einer LD $_{90}$ von 10 µg/ml, wogegen bei Gram – positiven Baktenen der Wert bei über 100 µg/ml liegt. Das hBD-2 ist ein induzierbares Peptid, welches selbst durch einige hitzeinaktivierte Baktenen induziert werden kann.

Ein weiteres humanes antibiotisches Protein ist das ALP, ein Proteaseinhibitor (J.A. KRAMPS et al. (1988) Biol. Chem. Hoppe Seyler, Vol 369, p 83 – 87), das von Keratinozyten produziert wird und sich gegen einige Bakterien und Pilze nichtet.

15

20

Die Angriffe der antibiotischen Protein sind sehr unterschiedlich. Eine Interaktion mit der Membran der Mikroorganismen sind üblich. Lipophile Strukturen vieler antibiotischer Protein und der Defensine sprechen für ein Interkalieren in den Membranen oder ein Penetrieren der Membranen. Die antimikrobiellen Proteine und Peptide wirken erst in den Mikroorganismen selbst toxisch.

AUFGABEN UND LÖSUNG:

Aufgabe der Erfindung ist es, weitere humane, antibiotische Proteine und deren Derivate anzubieten, welche wirksam gegen Mikroorganismen, insbesondere gegen Gram - negative und Gram - positive Bakterien, gegen Pilze und gegen Viren einsetzbar sind.

SEQUENZEN DER REIFEN PROTEINE

- 30 Die Aufgabe wird gelöst durch mindestens ein Protein,
 - a) das als aktives, reifes Protein / Peptid (Protein) einer der folgenden Sequenzen aufweist:
 - (i) SEQ ID NO: 1 (Sequenz Protokoll Nr. 1) (SAP-2); oder
 - (ii) SEQ ID NO: 2 (Sequenz Protokoll Nr. 2) (SAP-3);
- 35 oder
 - das als aktives, reifes Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter a) genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei mindestens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder

3

insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,

oder

c) das als aktives, reifes Protein posttranslationale Modifikationen einer der Sequenzen unter a) und b) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven Proteins beeinflussen.

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Protein, das antimikrobiell und / oder antibiotisch wirksam ist.

10

5

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Protein, das antimikrobiell oder antibiotisch wirksam ist und das eine Mobilität von 6 kDa in der SDS – Gelelektrophorese aufweist.

Mehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, das eine antibiotische Aktivität gegen *Escherichia coli* oder *Staph. aureus* in einer Konzentration von weniger als 100 µg/ml aufweist.

In der Literatur soll in Zukunft die Bezeichnung SAP-2 durch RNase 7 ersetzt werden, und der Begriff SAP-3 soll in Zukunft durch hBD-3 substituiert werden.

Sehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, welches ein mit der humanen Aminosäure – Sequenz versehenes Protein ist (vgl. SEQ ID NO: 1 bis 2).

25

30

35

20

Zu SEQ ID NO: 1

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 30 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 1. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 20 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 10 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun Aminosäuren. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

Zu SEQ ID NO: 2

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 10 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 2. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 6 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 4 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei Aminosäuren. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

10

15

20

25

SEQUENZEN DER REIFEN PROTEINE MIT SIGNALSEQUENZ

Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch mindestens ein Protein, das eine Signalsequenz und ein reifes erfindungsgemäßes Protein umfaßt,

- d) wobei das Protein eine der folgenden Sequenzen aufweist:
 - (i) SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
 - (i) SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3);

oder

e) wobei das Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter d) genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei wenigstens eine
Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder
insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des reifen aktiven Proteins
wesentlich zu beeinflussen,

oder

f) wobei das Protein posttranslationale Modifikationen einer der Sequenzen unter d) und e) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven reifen Proteins beeinflussen.

Zu SEQ ID NO: 3

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 35 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 3. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 23 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 12 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun Aminosäuren. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

15

20

Zu SEQ ID NO: 4

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 13 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 4. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 8 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 6 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier oder fünf Aminosäuren. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Am meisten bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, das ein rekombinantes Protein ist. Dabei können die Proteine glykosiliert sein, wenn es sich um SAP-2 oder eine Variante davon handelt.

Die erfindungsgemäßen Proteine umfassen die reifen Proteine und die entsprechenden Vorläuferproteine, welche sich aus einer Signalsequenz und der Sequenz des reifen Proteins zusammensetzen. Dabei geht die Signalsequenz der Sequenz des reifen Proteins voraus. Das reife Protein beginnt mit der zuvor genannten N - terminalen Sequenz unter Punkt a). Die Signalsequenz ist für die Durchdringung des endoplasmatischen Retikulums erforderlich

Ebenfalls ist es möglich, an den N - Terminus und / oder C - Terminus Schutzgruppen zu synthetisieren, welche aus der Peptidchemie bekannt sind.

Die **Schutzgruppe** des N - Terminus kann bestehen aus:

Alkyl-, Aryl-, Alkylaryl-, Aralkyl-, Alkylcarbonyl- oder Arylcarbonylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt sind Naphthoyl-, Naphthylpropionyl-, Benzoylgruppe oder einer Acylgruppe mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen.

Die **Schutzgruppe** des C - Terminus kann bestehen aus:

Einer substituierte oder unsubstituierte Alkoxy- oder Aryloxygruppe mit 1 bis 10

Kohlenstoffatomen oder aus einer Aminogruppe.

Weitere Schutzgrupp n - sowohl für den N - Terminus als auch für den C - Terminus - sind in Houben-Weyl (1974) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage

beschrieben. Die Beschreibung der Schutzgruppen in der zitierten Literaturangabe ist Teil der Offenbarung.

Die Seguenz des erfindungsgemäßen Protein kann am N - terminalen und / oder C - terminalen Ende an Stelle einer Schutzgruppe mit weiteren Rahmen -Aminosäure - Sequenzen (analog zu der Definition von "frame work" bei Diese weiteren Rahmen - Aminosäure -Antikörpern) verbunden sein. Sequenzen sind für die Bindung des erfindungsgemäßen Protein nicht wesentlich, sie können jedoch Träger von anderen Funktionen sein, so zum Beispiel Chelate oder auch zytostatische oder zytotoxische Sequenzen Derartige Rahmen - Aminosäure - Sequenzen treten in der Natur umfassen. Es kann sich dabei zum Beispiel um die zwischen den hypervariablen auf. Bereichen angeordneten Sequenzen des vanablen Bereichs eines Antikörper Diese Sequenzen werden als "Frame - Work" (Rahmensequenzen) handeln. bezeichnet. Als Rahmen - Aminosäure - Sequenzen sind weiterhin nicht abgespaltene Teil-Signalsequenzen eines sezemierten eukaryotischen Proteins bekannt, wobei das Protein in einem Bakterium exprimiert wird. Signalsequenzen haben bisweilen keinen Einfluß auf die Funktion des nachfolgenden Proteins. Ebenfalls ist es möglich, erfindungsgemäße Proteine hintereinander zu koppeln, wobei Rahmen - Aminosäure - Sequenzen zwischen den Einzelsequenzen angeordnet sind.

10

15

20

25

30

Um im Einzelfall zu entscheiden, ob ein bestimmtes erfindungsgemäßes Protein mit wenigstens einer Rahmen - Aminosäure - Sequenz und/oder wenigstens einer Schutzgruppe zum Gegenstand der Erfindung zählt, ist ein Vergleich zwischen

- (i) diesem Protein **mit** Rahmen Aminosäure Sequenz und/oder **mit** Schutzgruppe und
- (ii) demselben Protein **ohne** Rahmen Aminosäure Sequenz und **ohne** Schutzgruppe

anzustellen. Dabei sollten beide verglichenen Moleküle im wesentlichen dieselben Funktionen der Inhibierung oder Bindung aufweisen.

cDNA oder DNA kodierend für die erfindungsgemäßen Proteine

Die Erfindung umfaßt weiterhin auch eine cDNA oder DNA,

- wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Aminosäure Sequenzen aa) kodiert:
 - (i) SEQ ID NO: 1 (SAP-2);
 - SEQ ID NO: 2 (SAP-3); (ii)
 - SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder (iii)
 - SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3) (iv)

oder 10

15

wobei die cDNA oder DNA allelische Modifikationen einer der Amibb) nosäure - Sequenzen unter aa) kodiert,

> wonn wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen.

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein reifes erfindungsgemäßes Protein kodieren.

Die allelischen Modifikationen sind zuvor unter dem Punkt "Sequenzen der 20 reifen Proteine" definiert worden.

Zu SEQ ID NO: 1 und 3

Alle allelischen Modifikationen, die Gubstitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs der SEQ ID NO: 1 und 3. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

Zu SEQ ID NO: 2 und 4

Alle allelischen Modifikationen, die Gubstitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAS der SEQ ID NO: 2 und 4. Bevorzuat sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung eine cDNA oder DNA,

- cc) wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:
 - (i) SEQ ID NO: 5 (cDNA-SAP-2)
 - (ii) SEQ ID NO: 6; (cDNA-SAP-3);

oder

10

15

30

35

dd) wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter cc) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter cc) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

Zu SEQ ID NO: 5

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 5. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt. Zu SEQ ID NO: 6

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 6. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein erfindungsgemäßes Protein kodieren.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung umfaßt eine cDNA oder DNA, ee) wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:

- (i) SEQ ID NO: 7 (cDNA-PreSAP-2) oder
- (ii) SEQ ID NO: 8 (cDNA-PreSAP-3),

oder

15

35

ff) wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter ee) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter ee) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein erfindungsgemäßes Präprotein kodieren.

Zu SEQ ID NO: 7

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 5. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt.

Zu SEQ ID NO: 8

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 6. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Alle DNA-Konstrukte zählen auch dann zu den aufgezählten erfindungsgemäßen Sequenzen, wenn solche Nukleotide ausgetauscht werden, die aufgrund

10

15

20

des degenerierten Kodes dieselbe Aminosäure kodieren. Der Austausch derartiger Nukleotide ist offensichtlich und die sich entsprechenden Aminosäuren sind in jedem Biochemie - Lehrbuch offenbart. (R. KNIPPERS, 1982, 3. Auflage, Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag)

Die allelische Modifikationen sind zuvor definiert worden.

Wenn die Aktivität des Proteins angegeben wird, um festzustellen, ob die allelische Modifikation unter die Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine zählt, so ist immer das reife Protein zu messen, auch wenn die Signalsequenz ebenfalls angeführt ist. Sollte die Signalsequenz angegeben sein, so ist die Funktion immer an dem Protein zu messen, das nach Entfernen der Signalsequenz erhalten wird.

Die Aktivität der erfindungsgemäßen Proteine mißt sich an seiner Funktion, die eine antibiotische Wirkung, eine antimikrobielle Wirkung, und / oder die Bindung an gegen das reife humane Protein gerichtete Antikörper oder Bindungsmoleküle sein kann.

Weiterhin umfaßt die Erfindung Bindungsmoleküle (zum Beispiel Peptide oder deren Derivate), Einzelketten - Proteine (Single Chain Proteins), Antikörper oder Fragmente der Antikörper, die Domänen auf dem reifen, erfindungsgemäßen Protein spezifisch erkennen. Wenn das gereinigte erfindungsgemäße Protein vorliegt, ist es für den Fachmann leicht möglich, monoklonale Antikörper herzustellen. Dabei wird die bekannte Methode von Köhler und Milstein und deren Weiterführungen angewendet. Im Einzelnen wird in konventioneller Methode eine Maus mit dem gereinigten Protein mehrfach immunisiert, die Milzzellen entnommen und mit geeigneten Tumorzellen fusioniert. Die Hybride werden anschließend selektioniert. Die Bindungsmoleküle können als Diagnostikum eingesetzt werden, um zum Beispiel festzustellen, ob der jeweilige Patient an einem Mangel oder einer Variante der erfindungsgemäßen Proteine leidet.

30

35

25

Die Protein der Erfindung können zum Beispiel aus Hornschuppen von Psoriasis Patienten isoliert werden. Die Reinigung erfolgt gemäß der Beispiele. Die Proteine haben die zuvor beschriebene Aminosäure - Sequenzen. Sie haben ein Molekulargewicht von ca. 20000 ± 2000 bei SAP – 2 und 6000 ± 2000 bei SAP – 3 (siehe Beispiele). Der isoelektrische Punkt liegt im Bereich von pH 8,5 bis 10,5, wenn die im Beispiel beschriebene Methode angewendet wird. Die erfindungsgemäßen Proteine können natürlichen Ursprungs sein. Die

Proteine werden gewonnen, indem sie gemäß der Beispiele geemtet und

11

aufgearbeitet werden. Der Homschuppenüberstand wird gereinigt und die erfindungsgemäßen **Proteine** isoliert und angereichert. Alle Anreicherungsstufen der Isolierung und der Reinigung sind Teil der Erfindung. Bevorzugt sind die Anreicherungsstufen der Isolierung und Reinigung, bei denen die erfindungsgemäßen Proteine zu pharmazeutischen Zwecken So werden Reinigungen von 50 % der Proteine verwendet werden können. bezogen auf das Gesamtprotein erzielt, bevorzugt sind 85 %, mehr bevorzugt 95 % und am meisten bevorzugt 99 % der Proteine bezogen auf das Gesamtprotein.

10

20

30

Ebenso ist es möglich, die erfindungsgemäßen Proteine synthetisch herzustellen. Dazu zählt die Proteinsynthese nach J.M. SEWART and J.D. YOUNG, San Francisco, 1969 and J. MEIENHOFER, Hormonal Proteins and Peptides Vol. 2 p 46, Academic Press (New York), 1973 und E. SCHODER and K. LUBKE, The Peptides, Vol. 1, Academic Press (New York) 1965. Die Zitate sind Teil der Offenbarung.

Zu den synthetisch hergestellten Proteinen zählen auch die rekombinanten Proteine, die nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Je nach Wirtsorganismus können die erfindungsgemäßen Protein (bei SAP - 2) glykosyliert oder, wenn sie in Prokaryonten synthetisiert werden, unglykosyliert sein.

Die Funktion der Toxizität gegen Mikroorganismen ist in verschiedenen Testsystemen zu ermitteln. In den Beispielen sind gängige Testverfahren beschrieben. (vgl. SELSTED et al. (1993) J. Biol. Chem., Vol. 268, p 6641 – 6648 und GANZ et al. (1985) J. Clin. Invest. Vol. 76, p 1427 – 1435)

Die Proteine der Erfindung wirken antibiotisch gegen Mikroorganismen, insbesondere gegen die Gram - negativen und Gram - positiven Familien, dabei bevorzugt gegen die Arten *E. coli* und *Staphylococcus aureus*. Die Testsysteme sind ausführlich in Beispiel 3 beschreiben.

VEKTOREN MIT DER ERFINDGSGEMÄßEN DNA

Ein weiterer Teil der Erfindung ist ein Vektor, der eine erfindungsgemäße cDNA oder DNA, weiterhin einen passenden Promotor und gegebenenfalls einen passenden Enhancer enthält. Ebenfalls kann auch noch eine Signal - Sequenz umfaßt sein. Vektoren sind ausführlich in den europäischen Publikationen EP 0 480 651, EP 0 462 632 und EP 0 173 177 beschrieben.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung besteht in einer eukaryontischen oder prokaryontischen Wirtszelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist.

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen Proteins unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, mit den Schritten:

Kultivieren der Wirtszelle, Anreichem des Proteins, und Reinigen des Proteins.

Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zum Synthetisieren von einem der erfindungsgemäßen Proteine, wobei nach der Festphasen – Methode oder nach der Flüssigphasen – Methode die Proteine synthetisiert werden.

Das Verfahren, bei dem die erfindungsgemäßen Protein hergestellt werden, hat die folgenden Stufen:

das Carboxyl - Ende einer zu koppelnden Aminosäure, deren Aminogruppen und gegebenenfalls funktionellen Gruppen der Seitenkette eine Schutzgruppe tragen, reagiert mit dem freien Amino - Ende der zu koppelnden Aminosäure oder des zu koppelnden Proteinfragments in Gegenwart eines Kondensationsreagenzes,

und

15

25

30

35

im Falle einer nicht - endständigen Aminosäure wird anschließend die α - Amino - Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten und werden weitere Aminosäuren an die zu synthetisierende Protein - Kette nach den zuvor beschriebenen beiden Schritten gekoppelt oder

13

im Falle einer endständigen Aminosäure wird gegebenenfalls anschließend die α - Amino - Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten

und

nach Kopplung der letzten Aminosäure im Falle der Festphasen - Methode wird das Protein von der Festphase abgespalten.

ALLELISCHE MODIFIKATIONEN

Die meisten Deletionen, Insertionen und Substitutionen scheinen keine durchgreifende Änderung in der Charakteristik des Proteins der Erfindung zur Folge zu haben. Da es schwer ist, den genauen Effekt einer Substitution, einer Deletion oder einer Insertion im voraus anzugeben, muß die Funktion des veränderten Proteins mit der Funktion des erfindungsgemäßen Proteins verglichen werden. Die hierfür zu verwendenden Methoden sind in den Beispielen angegeben. Als Standard dient das Protein gemäß der SEQ ID NO: 1 bis 2, ebenfalls auch das Protein, das nach Beispiel 1 oder 2 gereinigt wird, und auch die Reinigungsmethode des Beispiels 1 oder 2 für das Vergleichsprotein.

Der genetische Code ist degenenert, das bedeutet, daß die meisten Aminosäuren von mehr als einem Codon aus drei Nukleotiden kodiert werden. Daher führen einige allelische Modifikationen auf der Ebene der Nukleotide nicht zu einer Änderung der Aminosäure - Sequenz. Daher ereignen sich allelische Modifikationen vornehmlich auf der Ebene der DNA und können sich sekundär auf die Aminosäure - Sequenz auswirken.

Die cDNA- oder DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßen Proteine kodieren, können gemäß konventioneller Techniken modifiziert werden, um Varianten der erfindungsgemäßen Proteine herzustellen, die im wesentlichen die gleiche Aktivität wie die beschriebenen und charaktensierten Proteine der Erfindung besitzen. Dabei wird die Aktivität so gemessen, wie es in den Beispielen beschrieben ist. Eine derartige Homologie – Austestung wird in CUNNIGHAM et al. (1989) Science, Vol. 243, p 1330 und O'DOWD et al. (1988) J. Biol. Chem., Vol. 263, p 15985 beschrieben.

35

Aminosäuren können substituiert werden, wobei mit einem Protein- oder Peptid-Mapping die Aminosäuren in ihren Positionen substituiert werden können, wobei anschließend die Aktivität der Modifizierung gemessen wird. Hierbei sind experimentell ermittelbare Substituierungen möglich, die aufgrund der chemischen Struktur der Seitenketten nicht ohne weiteres voraussagbar ist.

Die Mutationen werden durch die Homologie (Similarity) zweier zum Vergleich anstehender Proteine definiert. Der Ausdruck Homologie umfaßt ähnliche Aminosäuren und Lücken in den Sequenzen der Aminosäuren (Homologie = similarity). Die erfindungsgemäßen Proteine haben Aminosäure - Sequenzen, die eine Homologie von wenigstens 80 %, bevorzugt 90 %, mehr bevorzugt 95 % und am meisten bevorzugt 98 % der erfindungsgemäßen Strukturen besitzt, wie sie durch die Sequenzen unter SEQ ID NO: 1 bis 2 oder SEQ ID NO: 3 und 4 definiert sind und wie sie weiterhin nach der Reinigung gemäß der Beispiele erhalten werden.

10

15

20

25

30

35

Sequenzen von Proteinen lassen sich einfach verändem. Dabei werden die Aminosäuren in ihren jeweiligen Positionen ausgetauscht. Gleichzeitig ist notwendig, die so gewonnen Sequenzen auf ihre Funktion hin zu untersuchen. Der Aminosäure – Austausch kann nach zwei verschiedenen Methoden erfolgen.

Jede der Position eines Proteins wird nacheinander durch Alanin ersetzt. Anschließend wird die Funktion des jeweils um Alanin modifizierten Moleküls gemessen. Weicht der Meßwert von dem des Standard - Proteins ab, so ist diese Aminosäure an dieser Position des Proteins, an der nun ein Alanin angeordnet ist, für die Funktion essentiell. Hierdurch ergibt sich eine Karte des Proteins, aus der die konservativen Positionen und die einer Variation zugänglichen Positionen angegeben sind.

Eine andere Methode besteht darin, jede Position oder wesentliche Positionen eine Proteins gegen alle 20 natürlichen Aminosäuren auszutauschen. Anschließend wird von all diesen Modifikationen die Funktion ausgetestet. Die Methode wird beschrieben in Ronald FRANK (1992) Spot – Synthesis: easy technique for the poitionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. Tetrahedron Vol. 48, No 42, pp 9217 – 9232.

Beide Methoden sind besonders für Peptide geeignet, da diese mit der Festphasensynthese hergestellt werden. Dennoch läßt sich diese Methode mit Leichtigkeit auch für den Fachmann auf Proteine übertragen, wobei die Proteine in Zellen synthetisiert werden. Hierbei ist die Veränderung der DNA wesentlich, die jedoch bei den heutigen Techniken gezielt erfolgen kann.

10

15

Das Verfahren zur Modifizierung der Aminosäure – Sequenz kann wie folgt ausgeführt werden:

- (a) Mindestens eine Aminosäure in der Sequenz des Proteins wird durch eine natürliche oder auch gegebenenfalls durch eine nicht natürliche Aminosäure ersetzt.
- (b) Das modifizierte Protein wird nach jeder Substituierung auf die antibiotische Funktion gegenüber Mikroorganismen ausgetestet und die am meisten antibiotischen Proteine werden selektioniert.
- (c) In einem weiteren Schritt werden die am meisten antibiotischen Proteine mindestens in einem weiteren Zyklus gemäß der Punkte (a) und (b) durchlaufen.

Das Resultat einer solchen Modifizierung kann ein Protein sein, welches mit der ursprünglichen Sequenz nur noch Teile gemeinsam hat.

Wie zuvor erwähnt, umfaßt die Erfindung auch Modifikationen der DNA oder cDNA. Diese modifizierten Sequenzen hybridisieren unter stringenten Bedingungen mit den DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßen Proteine kodieren (siehe Sequenzen unter aa); cc) und ee)). Die cDNA- oder DNA-Sequenzen haben Nukleotid - Sequenzen, die eine Identität einschließlich kurzer (bis 15 Nukleotide) Deletionen und Insertionen von wenigstens 70 %, bevorzugt 82 %, mehr bevorzugt 90 % und am meisten bevorzugt von 95 % mit den erfindungsgemäßen cDNA- oder DNA-Sequenzen besitzen (siehe aa), cc) und ee)). Die

Identität einschließlich der kurzen (bis 15 Nukleotide) Deletionen und Insertionen kann durch eine Hybridisierung gemessen werden, wie sie in R. KNIPPERS, Molekulare Genetik, 1982, dritte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York beschrieben ist. Außerdem sind Standard – Rechenprogramme dem Fachmann bekannt, mit deren Hilfe Homologie zu

30

35

berechnen ist.

25

Die Erfindung umfaßt weiterhin eine cDNA oder DNA mit mindestens einer der Sequenzen von SEQ ID NO: 5 bis 8, oder

Nukleotidsequenzen, die mit einer der SEQ ID NO: 5 bis 8 unter selektiven, stringenten Bedingungen hybridisiert.

Stringente Bedingungen liegen dann vor, wenn die Salze, deren Konzentration, die Temperatur die anorganischen und organischen Lösungsmittel in typischer Form kontrolliert werden, wie dieses bei der etablierten Hybridisierungstechnik

praktiziert wird. Stringente Temperatur – Bedingungen schließen Temperaturen von mindestens 30 °C, bevorzugt mindestens 37 °C, mehr bevorzugt mindestens 45 °C, noch worteilhafter mindestens 45 °C, noch mehr bevorzugt mindestens 55 °C, noch vorteilhafter mindestens 65 °C und am meisten bevorzugt mindestens 70 °C ein. Stringente Salzkonzentration umfassen weniger als 1000 mM, bevorzugt weniger als 700 mM, mehr bevorzugt weniger als 400 mM, noch mehr bevorzugt weniger als 300 mM, vorteilhafter weniger als 200 mM und am meisten bevorzugt 150 mM. Die Kombination der Parameter ist wichtiger als der Bezug auf einen einzelnen Parameter. (WETMUR et al. (1968) J. Mol. Biol., Vol. 31, p 349)

10

15

25

30

POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN

Unter den zuvor erwähnten posttranslationalen Modifikationen versteht man Veränderungen, die während oder nach der Translation auftreten. Hierzu zählen die Glykosylierung, die Ausbildung von Disulfid - Brücken, die chemische Modifikationen der Aminosäuren, so zum Beispiel die Sulfatierung, die im Zusammenhang mit dem Hirudin beschrieben ist. (J.W. FENTON (1989) "Thrombin Interactions with Hirudin", Seminars in Thrombosis and Hemostasis Vol. **15, p** 265 – 268)

Die Glykosylierung ist eine wesentliche Funktion des endoplasmatischen Retikulums und/oder des Golgi-Apparates. Die Sequenz und die Verästelung der Oligosaccharide wird in dem endoplasmatischem Retikulum gebildet und in dem Golgi-Apparat verändert. Die Oligosaccharide können N-verknüpfte Oligosaccharide (Asparagin-verknüpfte) oder O-verknüpfte Oligosaccharide (Serin-,

Threonin- oder Hydroxylysin-verknüpfte) sein. Die Form der Glykosylierung ist von dem produzierenden Zelltyp und von der Art abhängig, von der der entsprechende Zelltyp stammt. Das Ausmaß und die Art der Glykosylierung kann durch Substanzen beeinflußt werden, wie es in der europäischen Publikation EP 0 222 313 beschrieben ist. Die Variation der Glykosylierung kann die Funktion des Proteins verändern.

Proteine bilden häufig kovalente Bindungen innerhalb der Ketten aus. Diese Disulfid - Brücken werden zwischen zwei Cysteinen hergestellt. Dabei wird das Protein spezifisch gefaltet. Die Disulfid - Brücken stabilisieren die dreidimensionale Struktur der Proteine.

17

ISOLIERUNG UND HERSTELLUNG DER ERFINDUNGSGEMÄßEN PROTEINE

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Reinigung von erfindungsgemäßen Proteinen, wobei das Verfahren aus folgenden Schritten besteht:

- (i) Extrahieren der Proteine aus natürlichen menschlichen Epithel Zellen, transfizierten Zellen oder Hautschuppen oder Zellkulturen, die gegenüber Mikroorganismen gegebenenfalls exponiert wurden,
- (ii) Auftragen des Extraktes auf eine Affinitätssäule mit anschließender Reversed Phase HPLC und

Eluieren über einen Salzgradienten, mit Säuren oder organischen Eluenten,

oder

(iii) Auftragen des Extraktes auf eine HPLC – Säule und Eluieren mit Salzen.

Die Reinigung ist ausführlich in den Beispielen beschrieben.

Bevorzugt ist eine Mikro - Mono S - HPLC - Säule.

Die Proteine werden bevorzugt gemäß Beispiel 1 und 2 gereinigt. Jedoch sind auch andere Isolierungs - und Reinigungsmethoden möglich:

Methods of Enzymology, Volume **182**: Guide to Protein Purification, ed. Murray P. DEUTSCHER, Academic Press, 1990;

Protein Purification Application - A Practical Approach, ed. E.L.V. HARRIS and S. ANGEL, IRL-Press 1990;

Protein Purification, Principles and Practice, Ropert SCOPES, Springer-Verlag 1982; and

Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, ed. H.-C. JANSON and L. RYDEN, VCH publishers 1989.

VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL

30

35

25

5

10

15

20

Die Proteine gemäß der Erfindung besitzen pharmakologische Effekte und sind deshalb als pharmazeutische Wirkstoffe verwendbar. Die Erfindung umfaßt ebenfalls ein Arzneimittel, das eines der erfindungsgemäßen Proteine oder ein Gemisch davon enthält. Weiterhin gehört zur Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der erfindungsgemäßen Proteine oder ein Gemisch erfindungsgemäßer Proteine enthält, in Gegenwart von pharmazeutisch verträglichen und annehmbaren Verbindungen und Trägern. Ebenfalls umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der

pharmazeutisch aktiven, erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und ein pharmazeutisch verträgliches Salz oder einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

Insbesondere zeigen die erfindungsgemäßen Protein gemäß der SEQ ID NO: 1 bis 2 eine toxische oder antibiotische Wirkung gegenüber Mikroorganismen, insbesondere gegenüber den Gruppen der Gram - negativen und Gram - positiven Bakterien, bevorzugt bei den Arten E. coli und St. aureus.

Testverfahren sind in dem Beispiel 3 beschrieben.

10

15

Die Versuchsergebnisse dieser *in vitro* Tests zeigen, daß die erfindungsgemäßen Proteine als Arzneimittel oder zur medizinischen Behandlung verwendet werden können. Diese Versuchsergebnisse lassen sich von den *in vitro* Testsystemen auf ein *in vivo* System übertragen, da es sich bei den Tests um etablierte Versuchsanordnungen handelt. Die Proteine der Erfindung können deshalb zur Behandlung und Prävention von Infektionen durch Mikroorganismen dienen. Die Proteine der Erfindung können als ein antibiotisches Medikament bei Säugern, insbesondere Menschen, zur Behandlung von Infektionen und / oder zur Infektionsprophylaxe eingesetzt werden

20

25

30

35

Die Erfindung liefert weiterhin

und Zusatz umfaßt.

- (i) die Verwendung eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von
 - Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen;
- (ii) ein Verfahren zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen, welches Verfahren eine Verabreichung einer Proteinmenge gemäß der Erfindung umfaßt, wobei die Menge die Krankheit unterdrückt, und wobei die Proteinmenge einem Patienten gegeben wird, der ein solches Medikament benötigt;
- (iii) eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen, welche Behandlung eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger

Für diese therapeutische Wirkung sind unterschiedliche Dosen geeignet. Sie hängen beispielsweise von dem verwendeten Protein, von dem Wirt, von der Art der Verabreichung und von der Art und der Schwere der zu behandelnden Zustände ab. Im allgemeinen sind jedoch bei Tieren zufriedenstellende Resultate zu erwarten, wenn die tägliche Dosen einen Bereich von 2 µg bis 2000 µg pro kg Körpergewicht umfassen. Bei größeren Säugetieren, beispielsweise dem Menschen, liegt eine empfohlenen tägliche Dosis im Bereich von 2 bis 2000 µg pro kg Körpergewicht, wenn das nach Beispiel 1 oder 2 gereinigte Protein verwendet wird. Zum Beispiel wird diese Dosis zweckmäßiger Weise in Teildosen bis zu viermal täglich verabreicht. Die täglich Dosis bei Prävention beträgt ein zehntel der Menge, die bei einer Infektion eingesetzt wird.

Das erfindungsgemäße Protein wird bevorzugt lokal oder epithelial verabreicht, so auch in den oberen und unteren Luftwegen.

Die erfindungsgemäßen Proteine können auf jedem üblichen Weg verabreicht werden, auch in Form von Cremen, Gele, halbfeste Arzneiformen, Suspensionen oder Inhalationslösungen oder Inhalationspulver.

20

Die vorliegende Erfindung stellt pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung, die eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Zusatz umfassen. Solche Zusammensetzungen können nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Dabei ist auf Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed Mack Publishing Company, East Pennsylvania (1980) hinzuweisen.

Weiterhin sind mit der erfindungsgemäßen DNA oder cDNA transfizierte syngene oder allogene humane Zellen als Medikament einsetzbar, indem diese Zellen auf dem Epithelgewebe aufgetragen werden oder sich in der Matrix eines Wundverbandes befinden.

DEFINITIONEN:

- 35 "Antimikrobiell" bedeutet, daß die erfindungsgemäßen Proteine
 - (i) das Wachstum und / oder die Proliferation von Mikroorganismen inhibieren und / oder verhindern und / oder
 - (ii) die Mikroorganismen oder deren Strukturen zerstören.

20

"Antibiotisch" bedeutet, daß die erfindungsgemäßen Proteine nachteilig auf die normalen biologischen Funktion der Mikroorganismen einwirken, wobei dieses Tod oder Zerstörung, ebenso auch Verhinderung von Wachstum oder Proliferation der Mikroorganismen, weiterhin auch Beeinträchtigung der Stoffwechselfunktionen bedeutet. Antibiotisch umfaßt somit den Begriff antimikrobiell. Eine antibiotische Wirkung kann auch bei Viren vorliegen. Daher umfaßt antibiotisch auch antiviral.

"Antiviral" bedeutet, daß DNA - und RNA - Viren mit Hilfe der Proteine der Erfindung bekämpft werden können. Hierbei sind verschiedene Eingriffsmöglichkeiten sinnvoll. Die Viren in ihrer Ruheform können beeinflußt werden. Die Anhaftphase an oder das Eindningen in den Wirt kann gestört werden, der Aufenthalt oder die Vermehrung (temperente oder virulente Phase) in dem Wirt kann beeinträchtigt werden.

Die erfindungsgemäßen Proteine können auch zur Wundheilung eingesetzt werden.

"Wundheilung" bedeutet, daß zum Beispiel die Kontraktion von Wunden beschleunigt wird, daß Bindegewebe im Wundbereich angesiedelt wird, daß Collagen angelagert wird. Ebenso sind Brandverletzung gut mit den Proteinen der Erfindung zu behandeln. Dabei kann ein Wundverband mit Proteinen angereichert sein oder Proteine von speziellen, insbesondere transfizierten Zellen im Wundverband exprimiert werden.

"Mikroorganismen" umfassen die Prokaryonten mit Eubakterien und Archaebakterien, die Pilze (Mycota mit Myxomyceten, Phycomyceten, und Eumyceten), die pflanzlichen und tierischen Einzeller, und Viren.

Der Ausdruck "Protein" umfaßt alle Längen an Aminosäuresequenzen, somit auch Peptide. Dabei können sich die Proteine auch aus verschiedenen Ketten zusammensetzen, die durch kovalente Bindungen oder Van der Vaal'sche Kräfte verbunden sind.

KOMBINATION MIT ANTIBIOTIKA:

Die erfindungsgemäßen Proteine können zusammen mit Antibiotika zum Beispiel aus der folgenden Gruppe verabreicht werden: Bacitracin, Gramicidin, Polymyxin, Vancomycin, Teichoplanin, aminoglycoside, Penicillin, Monobactam.

5

10

15

20

25

30

21

Diagnostikum:

Die Erfindung umfaßt weiterhin die Verwendung von mindestens einem erfindungsgemäßen Protein zur Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon.

Ebenfalls umfaßt die Erfindung die Verwendung von einem erfindungsgemäßen Antikörper oder Fragment davon als Diagnostikum.

5

10

Dabei sollen die erfindungsgemäßen Protein in Körpergeweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Auch können damit Nachweisverfahren durch Kopplung von Liganden an die erfindungsgemäßen Proteine hergestellt werden.

25

22

PCT/EP00/00776

BEISPIELE

Beispiel 1

Gewinnung von SAP-2

1.1. Isolierung:

- 50 g läsionaler Psoriasisschuppen wurde unter sauren Bedingungen bei Anwesenheit von Ethanol extrahiert und eingeengt. Dabei wurde dem Verfahren gefolgt, das beschrieben ist in J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 296.
- Nach Diafiltrieren gegen 0,02 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8 und Zentrifugation wurde der Überstand an einer Bakterien Affinitätssäule (E. coli oder Staph. aureus), die durch Kopplung hitze inaktivierter (70 °C über eine Stunde) E. coli oder Staphylococcus aureus Bakterien an N-hydroxysuccinimid aktivierte Sepharose Säule (Pharmacia) (10 x 5 mm) hergestellt worden war, chromatographiert.
- Dazu wurde die Säule zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen und anschließend gebundene Proteine mit einem sauren Puffer (0,1 mol/l Glycin Puffer, pH 3 mit 1 mol/l NaCl) eluiert.
 - Das gebundene Protein enthaltende Eluat wurde gegen 0,1 % wäßriger Trifluoressigsäure Lösung diafiltriert und analog zur Isolierung von chemotaktischen Peptiden (vgl. J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 296) zunächst einer präparativen Reversed Phase HPLC Trennung unterzogen. 20µl der jeweiligen Fraktionen wurden lyophilisiert, in 5 µl einer 0,01 prozentigen wäßrigen Essigsäure Lösung aufgenommen und mit Hilfe eines Plattendiffusions Testsystems (siehe Beispiel 3) (zur Identifikation antimikrobieller oder antibiotischer Proteine) analog zu M. E. SELSTED et al. (1993) J. Biol. Chem., Vol. 268, p 6641 6648 hinsichtlich der Anwesenheit antimikrobieller Peptide (mit Staph. aureus und E. coli als Test Bakterium) analysiert.
- Bei 40 % Acetonitril eluierte, antimikrobiell aktive Proteine wurden anschließend analog zur Isolierung chemotaktischer Peptide (J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 296) einer Mikro Mono S HPLC Trennung mit Hilfe des Smart HPLC System unterzogen. SAP-2 wurde bei 0,8 mol/l NaCl eluiert.
- Eine anschließende Mikro Reversed Phase HPLC Analyse mit Hilfe einer C 18 RP Säule ergab einen bei 52 % Acetonitril eluierenden Proteinpeak, der nach SDS Gel Elektrophorese (durchgeführt nach der Methode gemäß J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 296 eine

23

einzelne Proteinbande oder zwei Banden entsprechend der Mobilität von zirka 20 kDa ergab.

5 1.2. Sequenzierung von Fragmenten Sequenzierungsversuche ergaben die aminoterminale Sequenz mit der Numenerung aus der vollständigen Sequenz.

Pro Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His Met
5 10 15

Gln Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile Asn 15 20 25 30

Lys His Thr Lys Arg Cys Lys Asp 35

20 Der Edman Abbau des Peptidfragments lieferte eine Sequenz , die dem C – Terminus entspricht:

Asp Ser Gln Gln Phe His Leu Val Pro Val 115 120 25 His Leu Asp Arg Val Leu 125

1.3. Biologische Aktivität von SAP-2: MIC

Antimikrobielle Aktivität gegen *Staph aureus*: < 100 μg/ml gegen *E. coli*: < 50 μg/ml

RNase – Aktivität: 1.2 μ g SAP – 2 verdaute in einer Stunde bei 37 °C zirka 5 μ g humane RNA.

35

Beispiel 2

Gewinnung von SAP-3

2.1. Isolierung:

40 50 g läsionaler Psoriasisschuppen wurden unter sauren Bedingungen bei Anwesenheit von Ethanol extrahiert und eingeengt. Dabei wurde dem Verfahren

gefolgt das beschrieben ist in J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296.

Nach Diafiltrieren gegen 0,02 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8 und Zentrifugation wurde der Überstand an einer Anti – IL – 8 – Affinitätssäule, die durch Kopplung des monoklonalen anti – IL – 8 Antikörpers 52E4 an N-hydroxysuccinimid – aktivierte Sepharose – Säulen (Pharmacia) hergestellt worden war, chromatographiert. (analog zu J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 287. p 216 – 230)

Dazu wurde die Säule zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen und anschließend gebundene Proteine mit einem sauren Puffer (0,1 mol/l Glycin – Puffer, pH 3 mit 2 mol/l NaCl) eluiert.

Das gebundene Proteine enthaltende Eluat wurde gegen 0,1 % wäßriger Trifluoressigsäure – Lösung diafiltriert und analog zur Isolierung von chemotaktischen Peptiden (vgl. J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296) zunächst einer präparativen Reversed Phase HPLC – Trennung unterzogen. 20µl der jeweiligen Fraktionen wurden lyophilisiert, in 5 µl einer 0,1 prozentigen wäßrigen Essigsäure – Lösung aufgenommen und mit Hilfe eines Plattendiffusions - Testsystems (siehe Beispiel 3) (zur Identifikation antimikrobieller oder antibiotischer Proteine) analog zu M.E. SELSTED (1993) J Biol. Chem., Vol. 268, p 6641- 6648 hinsichtlich der Anwesenheit antimikrobieller Peptide (mit Staph. aureus oder E. coli als Test – Bakterien) analysiert.

Bei 37 % Acetonitril eluierte, antimikrobiell aktive Proteine wurden anschließend - analog zur Isolierung chemotaktischer Peptide (J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296) - einer Mikro – Mono S – HPLC – Trennung mit Hilfe des Smart – HPLC – System unterzogen. SAP-3 wurde bei 0,79 mol/l NaCl eluiert.

30

35

20

10

Eine anschließende Mikro – Reversed Phase – HPLC – Analyse mit Hilfe einer C – 18 RP – Säule ergab einen bei 38 % Acetonitril eluierenden Proteinpeak, der nach SDS – Gel - Elektrophorese (durchgeführt nach der Methode gemäß J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296 eine einzelne Proteinbande entsprechend der Mobilität von zirka 6 kDa ergab.

PCT/EP00/00776

25

2.2. Sequenzierung von Fragmenten

Sequenzierungsversuche ergaben nur die aminoterminale Sequenz.

Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly
5 10 15

Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile 20 25 30

10 Gly Lys

5

20

35

2.3. Biologische Aktivität von SAP-3: MIC

Antimikrobielle Aktivität gegen Staph aureus: < 100 μg/ml gegen E. coli: < 20 μg/ml

Beispiel 3

3. Bestimmung antimikrobieller Aktivität

3.1. Kultivierung der Mikroorganismen

Folgende Mikroorganismen wurden für die Versuche verwendet:

- Escherichia coli (E. coli) ATCC (American Type Culture Collection) Nr. 11303
- Pseudomonas aeruginosa ATCC Nr. 15442
 - Staphylococcus aureus (Klinische Isolate der Hautklinik Kiel)
 - Staphylococcus epidermidis (Klinische Isolate der Hautklinik Kiel)
 - Candida albicans (Klinische Isolate der Hautklinik Kiel)
- Die Mikroorganismen wurden auf Trypticase-Soy-Broth (TSB) Agarplatten bei 37°C kultiviert. Wurden sie längere Zeit nicht benötigt, lagerten sie bei 4°C. Für die Versuche wurde jeweils eine Einzelkolonie der entsprechenden

Mikroorganismen in 40 ml TSB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Zur Quantifizierung der Mikroorganismen wurde die optische Dichte der Übernachtkulturen bei 620 nm (OD₆₂₀) gemessen und die Koloniezahl durch Ausplattieren von entsprechenden

Verdünnungsstufen bestimmt

15

20

25

3.2. Plattendiffusions-Test

Um möglichst schnell und sensitiv Fraktionen der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritte (vgl. 3.3.) auf antimikrobielle Aktivität zu untersuchen, wurde ein radialer Plattendiffusions-Test (vgl. Hiemstra et al., 1993) verwendet.

Um Bakterien aus einer logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten, wurden 20 μ l einer 40 ml Übernachtkultur von *E. coli* oder *Staphylocccus aureus in* 8 ml Trypticase – Soy – Broth (TSB) geimpft und 3,5 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden dann 10 min bei 1000 g abzentrifugiert, mit 4°C kalten Natrium-Phosphat-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen, in 1 ml Natrium-Phosphat-Puffer resuspendiert und durch Bestimmung der OD₆₂₀ quantifiziert. Etwa 1x10⁶ Bakterien wurden dann in 8 ml vorgewärmtes (42 °C) Agarose - Medium gegeben, welches sich aus 1% Agarose in Natrium-Phosphat-Puffer + 1% TSB-Medium (v/v) + 0,03% Tween 80 (v/v) zusammensetzte. Nach Einfüllen dieses mit Bakterien versetzten Agarose-Mediums in eine Petrischale (\varnothing = 10cm ;Sarstedt, Newton) und anschließender Abkühlung bei Raumtemperatur, wurden in die nun verfestigte Agaroseschicht Löcher von 3

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Agaroseschicht mit 42°C warmen 2 x TSB-Medium + 1 % Agarose überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 20 bis 24 Stunden konnte man die Hemmhöfe der antimikrobiellen oder antibiotischen Fraktionen im Bakterienrasen deutlich erkennen. Die relativen antimikrobiellen oder antibiotischen Aktivitäten wurden durch den jeweiligen Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt.

mm Durchmesser gestanzt. In diese Löcher wurden dann 5 µl der zu testenden

Substanz in 0,01% Essigsäure gegeben.

3.3. Flüssigkultur-Test

Um den dosisabhängigen Wirkungsbereich eines antimikrobiellen oder antibiotischen Proteins abschätzen zu können, wurde ein Flüssigkultur-Testsystem verwendet (vgl. Ganz et al., 1985).

20

25

30

Etwa 10 μl einer 1x10⁷/ml-Verdünnung der entsprechenden Mikroorganismen in Natrium-Phosphat-Puffer (vgl. 3.1.) wurden zu 80 μl Natrium-Phosphat-Puffer zusammen mit 1,25% TSB - Medium (v/v) gegeben. Hinzugefügt wurden 10 μl 0,01% Essigsäure mit den entsprechenden Konzentrationen des antimikrobiellen oder antibiotischen Proteins (100 μg/ml, 50 μg/ml, 25 μg/ml, 12,5 μg/ml, und 6,25 μg/ml).

Diese Ansätze wurden in einer 96-Loch-Platte (Becton Dickinson, Heidelberg) 3 h bei 37°C unter leichtem Schütteln (150 Upm) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden von je 50 µl der Ansätze zehnfache Verdünnungsreihen mit Natrium-Phosphat-Puffer erstellt und jeweils in 3 Parallelen auf TSB-Agarplatten ausplattiert (100 µl). Nach 24 bis 36 Stunden Wachstum wurden die Kolonien ausgezählt.

Als Kontrolle wurde je ein Ansatz nur mit 10 µl 0,01% Essigsäure (ohne Protein) einmal direkt vor der Inkubation und einmal nach 2 h Inkubation bei 37°C ausplattiert.

4. Versuchsergebnisse

SAP-3 wurde in den angegebenen Konzentrationen bei 37° C für 3 Stunden mit 5 • 10⁴ KBE/ml (KBE = koloniebildende Einheiten) von *E. coli* und *Staphylococcus aureus* in 100 µl 10 mM Natriumphosphat - Puffer (pH = 7,4) zusammen mit 1% TSB inkubiert (TSB = Trypticase-Soy-Broth). Die antimikrobielle Aktivität von SAP-3 wurde durch Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt. Zuvor wurden 100 µl der jeweiligen Ansätze in zehnfachen Verdünnungsstufen) auf TSB – Platten ausplattiert. Danach wurden die Platten bei 37° C über Nacht inkubiert.

Es ergibt sich für E. coli und Staphylococcus aureus eine LD_{90} von 2,5 - 5 μ g/ml (LD_{90} = letale Dosis von 90%; gibt den Konzentrationsbereich der jeweiligen antimikrobiellen Substanz an, bei dem es zu einer 90%-igen Reduktion der eingesetzten koloniebildenden Einheiten nach dreistündiger Inkubation mit dieser antimikrobiellen Substanz kommt).

SAP-2 wurde in den angegebenen Konzentrationen bei 37^{0} C für 3 Stunden mit 1 • 10^{5} KBE / ml der jeweiligen Mikroorganismen in 100 μ l 10 mM

15

20

25

30

Natriumphosphat - Puffer (pH = 7,4) zusammen mit 1% TSB inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von SAP-2 wurde durch Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt. Zuvor wurden 100 µl der jeweiligen Ansätze in zehnfachen Verdünnungsstufen) auf TSB – Platten ausplattiert. Danach wurden die Platten bei 37° C über Nacht inkubiert.

Es ergibt sich eine LD $_{90}$ von 4 - 7,5 µg/ml für Propionibactenium acnes; 7,5 - 15 µg/ml für Staphylococcus aureus und Pseudomonas aeruginosa; weiterhin 15 - 30 µg/ml für Candida albicans.

Beispiel 5

5. Biochemische Charakterisierung antimikrobieller oder antibiotischer Proteine mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse wurde die Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet (Schägger und Jagow, 1987), weiche es gestattet, kleine Proteine unter 10 kDa sehr effizient aufzutrennen.

Die Durchführung geschah nach dem Protokoll der Autoren (Schägger und Jagow, 1987) in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer, wobei ein 16,5% Polyacrylamidgel mit einem Anteil von 6% Bisacrylamid und 6 M Harnstoff verwendet wurde.

Die Proben wurden vor dem Auftrag durch 0, 1 M DTT und Aufkochen denaturiert. Als molekularer Größenmarker diente der Standard S-17 (Sigma, St.Louis, USA). Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen:

- Zuerst wurde das Gel 30 min fixiert (30% Ethanol. 10% Eisessig).
- Anschließend erfolgte eine 30 min Inkubation in "Farmer's reducer"-Lösung.
- Dann wurde das Gel 3 x 10 min mit H₂O gewaschen und 20 min in Silbemitratlösung gefärbt.
- Abschließend erfolgte eine 10-15 min Inkubation in Entwickler-Lösung.
- Die Entwicklung wurde durch 5% Essigsäure abgestoppt und das Gel anschließend photographiert.

Für eine schnelle Analyse der HPLC-Fraktionen wurde das SDS-Page-Phast-System (Pharmacia, Freiburg) mit fertigen High-Density-Gelen (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers benutzt. Als Größenmarker diente der S-17-Marker von Sigma (s.o.). Die Detektion der aufgetrennten Moleküle erfolgte mit der oben beschriebenen Silberfärbung.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Protein,

das als aktives, reifes Protein / Peptid (Protein) einer der folgenden Sequenzen aufweist:

SEQ ID NO: 1 (Sequenz Protokoil Nr. 1) (SAP-2); oder

SEQ ID NO: 2 (Sequenz Protokoll Nr. 2) (SAP-3);

oder

das als aktives, reifes Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter a) genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei mindestens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,

oder

- das als aktives, reifes Protein posttranslationale Modifikationen einer der Sequenzen unter a) und b) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven Proteins beeinflussen.
 - 2. Protein nach Anspruch 1, das antimikrobiell und / oder antibiotisch wirksam ist.

20

- 3. Protein nach Anspruch 1 oder 2, das eine Mobilität von 6 kDa in der SDS Gelelektrophorese aufweist.
- 4. Protein, das eine Signalsequenz und ein reifes Protein nach einem der vorherigen Ansprüche umfaßt,

wobei das Protein eine der folgenden Sequenzen aufweist:

SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder

SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3);

oder

- wobei das Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter d) genannten Aminosäure Sequenzen aufweist, wobei wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des reifen aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,
 - oder
- wobei das Protein posttranslationale Modifikationen einer der Sequenzen unter d) und e) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven reifen Proteins beeinflussen.

WO 00/46245

31

- 5. Protein nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei an dem N Terminus und / oder C Terminus Schutzgruppen angeordnet sind.
- Protein nach einem der vorherigen Ansprüche, welches ein rekombinatnes
 Protein ist.
 - 7. cDNA oder DNA,

wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Aminosäure - Sequenzen kodiert:

SEQ ID NO: 1 (SAP-2);

10 SEQ ID NO: 2 (SAP-3);

SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder

SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3)

oder

15

wobei die cDNA oder DNA allelische Modifikationen einer der Aminosäure - Sequenzen unter aa) kodiert,

wonn wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen.

- 20 8. cDNA oder DNA nach Anspruch 7, wobei, die cDNA oder DNA ein reifes Protein kodiert.
 - cDNA oder DNA,

wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:

25 SEQ ID NO: 5; (cDNA-SAP-2)

SEQ ID NO: 6; (cDNA-SAP-3);

oder

30

wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter cc) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter cc) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

10. cDNA oder DNA,

wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen besitzt:

35 SEQ ID NO: 7; (cDNA-PreSAP-2) oder

SEQ ID NO: 8 (cDNA-PreSAP-3),

oder

wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter ee) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter ee) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

5

25

30

- 11. Vektor, der eine cDNA oder DNA nach einem der Ansprüche 7 bis 10, weiterhin einen passenden Promotor und gegebenenfalls einen passenden Enhancer enthält.
- 12. Vektor nach Anspruch 11 in einer eukaryontischen oder prokaryontischen 10 Wirtszelle, die mit dem Vektor transformiert ist.
 - 13. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als pharmazeutischer Wirkstoff.
- 15 14. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der Proteine nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Gemisch davon enthält, in Gegenwart von pharmazeutisch verträglichen und annehmbaren Verbindungen und Trägem.
- 15. Verfahren zum Synthetisieren von einem der Proteine nach einem der
 vorherigen Ansprüche 1 bis 6, wobei nach der Festphasen Methode oder nach der Flüssigphasen Methode die Proteine synthetisiert werden.
 - 16. Bindungsmoleküle, Einzelketten Proteine, Antikörper oder Fragmente der Antikörper, die Domänen auf dem reifen Protein nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6 spezifisch erkennen.
 - 17. Verwendung eines der Proteine nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder deren Gemisch zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen.
 - 18. Wundverband

mit mindestens einem Protein nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6 oder

mit syngenen oder allogenen humanen Zellen, die mit der DNA oder cDNA nach einem der Ansprüche 7 bis 10 transfiziert sind.

19. Verwendung von mindestens einem Protein nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon.

Verwendung von einem Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch
 19 als Diagnostikurn.

5

10

15

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

NAME:

Schering Aktiengesellschaft

STRASSE:

Müllerstraße 178

STADT:

Berlin

STAAT:

Deutschland

POSTLEITZAHL:

D-13342

TELEPHON:

030 / 4681 2515

TELEFAX:

030 / 4681 2058

(ii) TITEL DER ANMELDUNG:

Humane antibiotische Proteine

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN:

(iv) COMPUTER LESBARE FORM:

MEDIUM TYP:

Floppy Disk

COMPUTER:

IBM PC compatibel

ARBEITSSYSTEM:

OC - DOS / MS - DOS

2 / 6

	(2) INFORMATION ZU DEN SEQUENZEN
	SEQ ID NO: 1
	ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz
	SEQUENZLÄNGE: 128 Aminosäuren
5	ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein SAP-2
	URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Homschuppen von Psoriasis Patienten EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein
10	Lys Pro Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His 5 10 15
10	Met Gln Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile 20 25 30
15	Asn Lys His Thr Lys Arg Cys Lys Asp Leu Asn Thr Phe Leu His 35 40 45
	Glu Pro Phe Ser Ser Val Ala Ala Thr Cys Gln Thr Pro Lys Ile 50 55 60
20	Ala Cys Lys Asn Gly Asp Lys Asn Cys His Gln Ser His Gly Pro 65 70 75
25	Val Ser Leu Thr Met Cys Lys Leu Thr Ser Gly Lys Tyr Pro Asn 80 85 90
25	Cys Arg Tyr Lys Glu Lys Arg Gln Asn Lys Ser Tyr Val Val Ala 95 100 105
30	Cys Lys Pro Pro Gln Lys Lys Asp Ser Gln Gln Phe His Leu Val
	Pro Val His Leu Asp Arg Val Leu 125
35	SEQ ID NO: 2
33	ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz
	SEQUENZLÄNGE: 45 Aminosäuren
	ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein SAP-3
	URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Homschuppen von Psoriasis Patienten
40	EIGENSCHAFTEN: Funktion von einem antibiotischen Protein
	Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly 5 10 15
45	Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile 20 25 30
	Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys 35 40 45

5	ART SEQ ART URS	UEN: DES PRÜI	SEQ ZLÄN MOL	GE: EKÜL CHE H	.S:	'UNF	156 Prä _l Γ: Hoi	Amir protei msch	ure - S losäul n SAF upper ches I	ren P-2, F I von	roteir Psori		-	-	enz
10	Met	Ala	Pro	Ala -25	Arg	Ala	Gly	Phe	Cys -20		Leu	Leu	Leu	Leu -15	Leu
	Leu	Leu	Gly	Leu -10	Trp	Val	Ala	Glu	Ile -5	Pro	Val	Ser	Ala -1	Lys 1	Pro
15	Lys	Gly	Met 5	Thr	Ser	Ser	Gln	Trp 10	Phe	Lys	Ile	Gln	His 15	Met	Gln
20	Pro	Ser	Pro 20	Gln	Ala	Суѕ	Asn	Ser 25	Ala	Met	Lys	Asn	Ile 30	Asn	Lys
	His	Thr	Lys 35	Arg	Cys	Lys	Asp	Leu 40	Asn	Thr	Phe	Leu	His 45	Glu	Pro
25			50					55	Gln			-	60		_
			65	_	-		_	70	Gln			_	75		
30			80					85	Gly				90		
35	Tyr	Lys	Glu 95	Lys	Arg	Gln	Asn	Lys 100	Ser	Tyr	Val	Val	Ala 105	Cys	Lys
	Pro	Pro	Gln 110	Lys	Lys	Asp	Ser	Gln 115	Gln	Phe	His	Leu	Val 120	Pro	Val
40	His	Leu	Asp 125	Arg	Val	Leu									

PCT/EP00/00776 WO 00/46245

4 / 6

SEQ ID NO: 4

ART DER SEQUENZ:

Aminosäure - Sequenz

SEQUENZLÄNGE:

67 Aminosäuren

ART DES MOLEKÜLS:

Präprotein, d.h. das reifen Protein SAP-

3 mit Signalsequenz

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Homschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN:

als reifes Protein Funktion von einem

antibiotischen Protein

Met Arg Ile His Tyr Leu Leu Phe Ala Leu Leu Phe Leu Phe Leu -15 -10 10 -20

Val Pro Val Pro Gly His Gly Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys

Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys 15 15 10

Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg 25

20

5

Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys 40

SEQ ID NO: 5

25 ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE:

384 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein kodierende cDNA für SAP-2

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Homschuppen von Psoriasis Patienten antibiotisches Protein kodierende cDNA **EIGENSCHAFTEN:**

30

40

ATG CAG CCC AGC CCT CAA GCA TGC AAC TCA GCC ATG AAA AAC ATT 090

AAG CCC AAG GGC ATG ACC TCA TCA CAG TGG TTT AAA ATT CAG CAC 045

AAC AAG CAC ACA AAA CGG TGC AAA GAC CTC AAC ACC TTC CTG CAC 135

GAG CCT TTC TCC AGT GTG GCC GCC ACC TGC CAG ACC CCC AAA ATA 180

GCC TGC AAG AAT GGC GAT AAA AAC TGC CAC CAG AGC CAC GGG CCC 225

GTG TCC CTG ACC ATG TGT AAG CTC ACC TCA GGG AAG TAT CCG AAC 270

TGC AGG TAC AAA GAG AAG CGA CAG AAC AAG TCT TAC GTA GTG GCC 315

384

45 TGT AAG CCT CCC CAG AAA AAG GAC TCT CAG CAA TTC CAC CTG GTT 360

CCT GTA CAC TTG GAC AGA GTC CTT

SEQ ID NO: 6

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE: 135 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: das reife Protein kodierende cDNA für SAP-3
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten
EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

GGA ATC ATA AAC ACA TTA CAG AAA TAT TAT TGC AGA GTC AGA GGC 045

10

GGC CGG TGT GCT GTG CTC AGC TGC CTT CCA AAG GAG GAA CAG ATC 090

GGC AAG TGC TCG ACG CGT GGC CGA AAA TGC TGC CGA AGA AAG AAA 135

15

SEQ ID NO: 7

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE:

468 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Präprotein kodierende cDNA für SAP-2, SAP-2 mit

20

Signalsequenz

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

ATG GCA CCG GCC AGA GCA GGA TTC TGC CCC CTT CTG CTG CTT CTG 045 25 CTG CTG GGG CTG TGG GTG GCA GAG ATC CCA GTC AGT GCC AAG CCC 090 AAG GGC ATG ACC TCA TCA CAG TGG TTT AAA ATT CAG CAC ATG CAG 135 30 CCC AGC CCT CAA GCA TGC AAC TCA GCC ATG AAA AAC ATT AAC AAG 180 CAC ACA AAA CGG TGC AAA GAC CTC AAC ACC TTC CTG CAC GAG CCT 225 TTC TCC AGT GTG GCC GCC ACC TGC CAG ACC CCC AAA ATA GCC TGC 270 35 AAG AAT GGC GAT AAA AAC TGC CAC CAG AGC CAC GGG CCC GTG TCC 315 CTG ACC ATG TGT AAG CTC ACC TCA GGG AAG TAT CCG AAC TGC AGG 360 40 TAC AAA GAG AAG CGA CAG AAC AAG TCT TAC GTA GTG GCC TGT AAG 405 CCT CCC CAG AAA AAG GAC TCT CAG CAA TTC CAC CTG GTT CCT GTA 450 CAC TTG GAC AGA GTC CTT 468

PCT/EP00/00776 WO 00/46245

6 / 6

OLG ID ING. C	SEQ	ID	NO	: 8
---------------	-----	----	----	-----

5

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE: 201 Nukleotide

AAA TGC TGC CGA AGA AAG AAA

das Präprotein kodierende cDNA für SAP-3 ART DES MOLEKÜLS:

(Signalsequenz und reife Protein)

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten antibiotisches Protein kodierende cDNA **EIGENSCHAFTEN:**

ATG AGG ATC CAT TAT CTT CTG TTT GCT TTG CTC TTC CTG TTT TTG 045 10 GTG CCT GTC CCA GGT CAT GGA GGA ATC ATA AAC ACA TTA CAG AAA 090 TAT TAT TGC AGA GTC AGA GGC GGC CGG TGT GCT GTG CTC AGC TGC 135 15 CTT CCA AAG GAG GAA CAG ATC GGC AAG TGC TCG ACG CGT GGC CGA 180 201



(51) Internationale Patentklassifikation 7: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46245 C07K 14/47, C12N 15/12, 9/22, **A3** (43) Internationales A61L 15/03 Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00) (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00776 (81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES. FI. GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Februar 2000 (01.02.00) KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, (30) Prioritätsdaten: SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, 199 05 128.3 1. Februar 1999 (01.02.99) UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, DE 199 49 436.3 8. Oktober 1999 (08.10.99) DE MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHER-LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, ING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 178, D-13353 Berlin (DE). Veröffentlicht (72) Erfinder; und Mit internationalem Recherchenbericht. (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CHRISTOPHERS, Enno [DE/DE]; Schlossgarten 12, D-24105 Kiel (DE). HARDER, Jürgen [DE/DE]; Esmarchstrasse 55, D-24105 Kiel (DE). (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-SCHRÖDER, Jens [DE/DE]; Kleiner Bornkrug 7, D-24241 23. November 2000 (23.11.00) Blumenthal (DE).

- (54) Title: HUMAN ANTIBIOTIC PROTEINS
- (54) Bezeichnung: HUMANE ANTIBIOTISCHE PROTEINE
- (57) Abstract

The invention relates to proteins, notably SAP-2 and SAP-3, having an antibiotic action. The invention also relates to a method for purifying certain antimicrobial proteins, as well as to a use of said antimicrobial proteins for antibiotic therapy or to a use of cells which were transfected with a DNA which codes for the proteins provided for in the invention.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Proteine, die antibiotisch wirksam sind. Es handelt sich um SAP-2 und SAP-3. Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten antimikrobiellen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der antimikrobiellen Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die erfindungsgemässen Proteine kodiert.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

Albanien						
	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
Armenica	FI	Finnland	LT	Litauen		Slowakei
Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg		Senegal
Australien	GA	Gabun	LV	-		Swasiland
Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC			Tschad
Bosnien-Herzegowina	GE		_			Togo
Barbados	GH	Ghana		-		Tadschikistan
Belgien	GN	Guinea		•		Turkmenistan
Burkina Faso	GR	Griechenland				Türkei
Bulgarien	HU	Ungarn	MI.			
Benin	IE	Irland				Trinidad und Tobago Ukraine
Brasilien	IL	Israel				Uganda
Belarus	IS	Island				Vereinigte Staaten von
Kanada	П	Italien			03	Amerika
Zentralafrikanische Republik	JP	Japan			117	Ushekistan
Kongo	KE	Kenia		_		Vietnam
Schweiz	KG	Kirgisistan				Jugoslawien
Côte d'Ivoire	KP	•		5		Zimbabwe
Kamerun		Korea			ZW	Zimbabwe
China	KR	Republik Korea				
Kuba	KZ	Kasachstan				
Tschechische Republik	LC	St. Lucia				
Deutschland	u	Liechtenstein				
Dänemark	LK	Sri Lanka				
Estland	LR	Liberia				
	Österreich Australien Aserbaidschan Bosnien-Herzegowina Barbados Belgien Burkina Faso Bulgarien Benin Brasilien Belarus Kanada Zentralafrikanische Republik Kongo Schweiz Côte d'Ivoire Kamerum China Kuba Tschechische Republik Deutschland Dänemark	Osterreich FR Australien GA Aserbaidschan GB Bosnien-Herzegowina GE Barbados GH Belgien GN Burkina Faso GR Burkina Faso GR Burgarien HU Benin IE Brasilien IL Belarus IS Kanada IT Zentralafrikanische Republik JP Kongo KE Schweiz KC Côte d'Ivoire KP Kamerum China KR Kuba KZ Tsehechische Republik LC Deutschland L1 Dänemark LK	Osterreich PR Prankreich Australien GA Gabun Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich Bosnien-Herzegowina GE Georgien Barbados GH Ghana Belgien GN Guinea Burkina Faso GR Griechenland Bulgarien HU Ungarn Benin IE Irland Brasilien IL Israel Belarus IS Island Kanada IT Italien Zentralafrikanische Republik JP Japan Kongo KE Kenia Schweiz KG Kirgisistan Côte d'Ivoire KP Demokratische Volksrepublik Kamerun China KR Republik Korea Kuba KZ Kasachstan Tschechische Republik LC St. Lucia Deutschland LI Liechtenstein Dänemark LK Sri Lanka	Osterreich FR Frankreich LU Australien GA Gabun LV Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Bosnien-Herzegowina GE Georgien MD Barbados GH Ghana MG Belgien GN Guinea MK Burkina Faso GR Griechenland Bulgarien HU Ungarn ML Benin IR Irland MN Brasilien IL Israel MR Belarus IS Island MW Kanada IT Italien MX Zentralafrikanische Republik JP Japan NE Kongo KE Kenia NL Schweiz KG Kirgisistan NO Côte d'Ivoire KP Demokratische Volksrepublik NZ Kamerun KR Kuba KZ Kasachstan RO Trachechische Republik LC St. Lucia RU Demuschland LI Liechtenstein SD Dänemark LK Sri Lanka SE	Osterreich PR Frankreich LU Luxemburg Australien GA Gabun LV Lettland Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Monaco Bosnien-Herzegowina GE Georgien MD Republik Moldan Barbados GH Ghana MG Madagaskar Belgien GN Guinea MK Die ehemalige jugoslawische Burkina Faso GR Griechenland Republik Mazedonien Bulgarien HU Ungarn ML Mali Benin IE Irland MN Mongolei Brasilien IL Israel MR Mauretanien Belarus IS Island MW Malawi Kanada IT Italien MX Mexiko Zentralafrikanische Republik JP Japan NE Niger Kongo KE Kenia NL Niederlande Schweiz KG Kirgisistan NO Norwegen Côte d'Ivoire KP Demokratische Volksrepublik NZ Neusceland Kamerun KR Republik Korea PL Polen China KR Republik Korea PT Portugal Kuba LZ Kasachstan RO Russische Föderation Deutschland LL Liechtenstein SD Sodan Dänemark LK Sri Lanka SE Schweden	Osterreich FR Frankreich LU Luxemburg SN Australien GA Gabun LV Lettland SZ Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Monaco TD Bosnien-Herzegowina GE Georgien MD Republik Moldan TG Barbados GH Ghana MG Madagaskar TJ Belgien GN Guinea MK Die ehemalige jugoslawische TM Burkina Faso GR Griechenland Republik Mazedonien TR Bulgarien HU Ungarn ML Mali TT Benin IE Irland MN Mongolei UA Brasilien IL Israel MR Mauretanien UG Belarus IS Island MW Malawi Belarus IS Island MW Malawi Centralafrikanische Republik JP Japan NE Niger UZ Kongo KE Kenia NL Niederlande VN Schweiz KG Kirgisistan NO Norwegen YU Korea PL Polen China KR Republik Korea PL Polen China KR Republik Korea PT Portugal Kuba LK Sri Lanka SE Schweden

In... ational Application No PCT/EP 00/00776

A CLASS IPC 7	FICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/47 C12N15/12 C12N9/	22 A61L15/03			
According t	o International Patent Classification (IPC) or to both national classi	fication and IPC			
	SEARCHED				
Minimum de IPC 7	ocumentation searched (classification system followed by classific CO7K C12N A61L	ation symbols)			
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that	t such documents are included in the fields so	earched .		
	data base consulted during the international search (name of data		n		
EPO-In	ternal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STR/	AND			
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.		
P,X	EP 0 943 679 A (INNOGENETICS NV 22 September 1999 (1999-09-22) the whole document)	1-17		
Ρ,χ	WO 99 13080 A (ZYMOGENETICS INC 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document		1-19		
Α	HARDER J: "A PEPTIDE ANTIBIOTION HUMAN SKIN" NATURE,GB,MACMILLAN JOURNALS LTG vol. 387, 26 June 1997 (1997-06-1861 XP002072639 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	D. LONDON,	1-17		
		-/			
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	in annex.		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the carlier document but published on or after the international filing date To document which may throw doubts on priority claim(a) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) To document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means To document published after the international filing date but later than the priority date claimed invention or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the cited to unde					
	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sea			
	6 July 2000	10/08/2000			
Name and n	nailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer De Kok, A			

In. ational Application No PCT/EP 00/00776

		PCT/EP 00/	00776
(Continu	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	·	Relevant to claim No.
ategory	Chancel of occurrent, was a successful wind appropriate, of the leavant passages	[New York to Call 1110.
	J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 268, 1998, pages 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US cited in the application page 286		1
	ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 18, 1996, pages 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 abstract page 3508 -page 3509 page 3511, column 2 page 3513, column 1, last paragraph		1,2,4,7, 9-11,13, 17
A	WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21 July 1994 (1994-07-21) claim 10		1,18

International application No.

PCT/EP 00/00776

The International Searching Authority found that this international application contains multiple inventions, as follows:

- 1. Claims Nos. 1-20, all in part SAP-2 protein, production and use thereof
- 2. Claims Nos.1-20, all in part SAP-3 protein, production and use thereof

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1992)

International application No. PCT/EP 00/00776

Continuation of box 1.2 Claims Nos.16,20

Claims Nos. 16 and 20 relate to a disproportionately large number of possible compounds of which only a small proportion are supported by the description according to the terms of Article 6 PCT and/or can be considered disclosed according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. For this reason, said claims were not searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1992)

information on patent family members

tm. dional Application No PCT/EP 00/00776

Patent document cited in search repor	t	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0943679	Α	22-09-1999	AU WO	3411999 A 9947652 A	11-10-1999 23-09-1999
W0 9913080	A	18-03-1999	AU EP	9391598 A 1012285 A	29-03-1999 28-06-2000
WO 9415561	A	21-07-1994	AU AU DE EP JP	694092 B 3469993 A 69325721 D 0679076 A 8507702 T	16-07-1998 15-08-1994 26-08-1999 02-11-1995 20-08-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inc. ationales Aktenzeichen PCT/EP 00/00776

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES 1PK 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N9/22 A61L15/03 Nach der Internationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C07K C12N A61L Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Warrend der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Ansoruch Nr. P,X EP 0 943 679 A (INNOGENETICS NV) 1-17 22. September 1999 (1999-09-22) das ganze Dokument P,X WO 99 13080 A (ZYMOGENETICS INC) 1 - 1918. März 1999 (1999-03-18) das ganze Dokument HARDER J: "A PEPTIDE ANTIBIOTIC FROM A 1-17 HUMAN SKIN" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, Bd. 387, 26. Juni 1997 (1997-06-26), Seite 861 XP002072639 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -/--X Siehe Anhang Patentiamilie Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffentlichung, die den altgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Veröffentlining von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist ausoeführt) "O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 26. Juli 2000 10/08/2000 Bevollmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 De Kok, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ins. donales Aktenzeichen
PCT/EP 00/00776

A J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt Seite 286 A ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMIL!" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 ZUsammenfassung Seite 3509 Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz A WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21. Juli 1994 (1994-07-21) Anspruch 10	A J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt Seite 286 A ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN 9-11 RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz A WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 1,18			PCT/EP 00	700776
A J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt Seite 286 A ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN 9-11,13, RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz A WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 1,18	A J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt Seite 286 A ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING 1,2, AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN 9-11 RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING 17 DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 ZUSAMMenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz A WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 1,18			den Teile	Potr Assessment Nr
structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt Seite 286 A ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz A WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21. Juli 1994 (1994-07-21)	structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt Seite 286 A ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN 9-11 RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz A W0 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21. Juli 1994 (1994-07-21)		To the state of th		Bed. Arspidci Ni.
AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz A W0 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21. Juli 1994 (1994-07-21)	AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz A W0 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21. Juli 1994 (1994-07-21)	A	structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XPO00864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt		1
21. Juli 1994 (1994-07-21)	21. Juli 1994 (1994-07-21)	А	AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2		9-11,13,
		A	21. Juli 1994 (1994-07-21)		1,18

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-20, alle teilweise

Protein SAP-2, seine Herstellung und seine Verwendung

2. Ansprüche: 1-20, alle teilweise

Protein SAP-3, seine Herstellung und seine Verwendung

WEITERE ANGABEN

PCT/ISAV 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 16 20

Die geltenden Patentansprüche 16 und 20 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, von denen keiner als im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung gestützt und/oder als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht entsprechend gestützt und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher würden diese Ansprüche nicht recherchiert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur seiben Patentfamilie gehören

In. dionales Aktenzeichen
PCT/EP 00/00776

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		tglied(er) der atentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
EP	0943679	A	22-09-1999	AU WO	3411999 A 9947652 A	11-10-1999 23-09-1999	
WO	9913080	Α	18-03-1999	AU EP	9391598 A 1012285 A	29-03-1999 28-06-2000	
WO	9415561	A	21-07-1994	AU AU DE EP JP	694092 B 3469993 A 69325721 D 0679076 A 8507702 T	16-07-1998 15-08-1994 26-08-1999 02-11-1995 20-08-1996	

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

GEÄNDERTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum 10. August 2000 (10.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer WO 00/46245 A3

DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,

IN, 1S, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,

GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12, 9/22, A61L 15/00

C07K 14/47,

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/00776

(22) Internationales Anmeldedatum:

1. Februar 2000 (01.02.2000)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

199 05 128.3

1. Februar 1999 (01.02.1999) I

199 49 436.3

8. Oktober 1999 (08.10.1999) DE

Veröffentlicht:

SN, TD, TG).

Mit internationalem Recherchenbericht.

UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (mar für US): CHRISTOPHERS, Enno [DE/DE]; Schlossgarten 12, D-24105 Kiel (DE). HARDER, Jürgen [DE/DE]; Esmarchstrasse 55, D-24105 Kiel (DE). SCHRÖDER, Jens [DE/DE]; Kleiner Bornkrug 7, D-24241 Blumenthal (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 23. November 2000 Veröffentlichungsdatum des geänderten internationalen Recherchenberichts: 22. März 2001

(15) Informationen zur Berichtigung: siehe PCT Gazette Nr. 12/2001 vom 22. März 2001, Section II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: HUMAN ANTIBIOTIC PROTEINS

(54) Bezeichnung: HUMANE ANTIBIOTISCHE PROTEINE

(57) Abstract: The invention relates to proteins, notably SAP-2 and SAP-3, having an antibiotic action. The invention also relates to a method for purifying certain antimicrobial proteins, as well as to a use of said antimicrobial proteins for antibiotic therapy or to a use of cells which were transfected with a DNA which codes for the proteins provided for in the invention.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Proteine, die antibiotisch wirksam sind. Es handelt sich um SAP-2 und SAP-3. Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten antimikrobiellen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der antimikrobiellen Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die erfindungsgemässen Proteine kodiert.



REVISED VERSION

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna / Application No

PCT/EP 00/00776

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C97K14/47 C12N15/12

A61L15/80

According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation recruited (cleanification IPC 7 C07K C12N A61L fred (classification system todowed by elassification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

C12N9/22

Electronic data base consulted during the interretional search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Station of document, with indication, where appropriate, of the relevant passanges	Relevant to claim No.
P,X	EP 0 943 679 A (INNOGENETICS NV) 22 September 1999 (1999-09-22) the whole document	1-17
P,X	WO 99 13080 A (ZYMOGENETICS INC) 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document	1-19
A	HARDER J: "A PEPTIDE ANTIBIOTIC FROM HUMAN SKIN" NATURE,GB,MACHILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 387, 26 June 1997 (1997-06-26), page 861 XP002072639 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	1-17
	-/	

ł	X	Further documents are listed in the	continuation of bas C.
4		·	COLUMNICATION OF BASE OF

Patent family members are listed in annex.

oist astegories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
- "E" series document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throse doubts on priority claim(s) or which is cled to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disolature, use, exhibition or
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- To later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but oried to understand the principle or theory underlying the
- "X" document of personal relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is token alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive slop when the document is combined with one or more other such document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" dutument member of the same patent family

Date of mailing of the International search report

Date of the actual completion of the international search

30 October 2000 30 October 2000

Name and mailing address of the ISA

European Palent Office, P.B. 5818 Palentiesn 2 Ns. - 2280 HV Rijaviji Tel. (+31-70) 340-2040, Tz. 31 651 apo ni, Faz: (+31-70) 348-3018

Authorized officer

De Kok, A

j	Internal ' / Application No	
i	PCT/EP 00/00776	

		PCT/EP 00/00776		
	INSON) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to stake No.		
A	J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 268, 1998, pages 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US cited in the application page 286	1		
A	ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY. vol. 24. no. 18, 1996, pages 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 abstract page 3508 -page 3509 page 3511, column 2 page 3513, column 1, last paragraph	1,2,4,7, 9-11,13, 17		
A	WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21 July 1994 (1994-07-21) claim 10	1,18		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International application No.
PCT/EP 00/00776

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This inte	ernational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1.	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. 🗶	Claims Nos.: 16 20 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: See supplemental sheet PCT/ISA/210
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This Inte	mational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
	See annex
2. X 3.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark o	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No. PCT/EP 00/00776

Continuation of box 1.2 Claims Nos.16,20

Claims Nos. 16 and 20 relate to a disproportionately large number of possible compounds of which only a small proportion are supported by the description according to the terms of Article 6 PCT and/or can be considered disclosed according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. For this reason, said claims were not searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

information on patent lamily members

PCT/EP 00/00776

•	Patent document ited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
l	EP 0943679	A	22-09-1999	AU WO	3411999 A 99 4765 2 A	11-10-1999 23-09-1999
ì	NO 9913080	A	18-03-1999	AU EP	9391598 A 1012285 A	29-03-1999 28-06-2000
1	iO 9415561	A	21-07-1994	AU AU DE EP JP	694092 B 3469993 A 69325721 D 0679076 A 8507702 T	16-07-1998 15-08-1994 26-08-1999 62-11-1995 20-08-1996

REVIDIERTE FASSUNG

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inten nales aktenzeichen PCT/EP 00/00776

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANNELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N9/22 A61L15/00 Nach der Internationalen Patentidassifikation (IPK) oder mach der nationalen Klassifikation und der IPK B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprütztoff (Klassifikationasystem und Klassifikationasyrrbole) IPK 7 CO7K C12N A61L Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenburk (Name der Datenbank und evtl. verwandete Suchbegritte) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Kamgone' | Bezeichnung der Veraffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Bett, Ansprucin Nr P,X EP 0 943 679 A (INNOGENETICS NV) 1-17 22. September 1999 (1999-09-22) das ganze Dokument WO 99 13080 A (ZYMOGENETICS INC) 18. März 1999 (1999-03-18) P.X 1-19 das ganze Dokument Α HARDER J: "A PEPTIDE ANTIBIOTIC FROM 1-17 HUMAN SKIN* NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON. Bd. 387, 26. Juni 1997 (1997-06-26). Seite 861 XP002072639 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -/--Weitere Veröffentlichungen eind der Fortsetzung von Feld C zu X Siehe Anhong Patent/amilie * Basondere Katsgorien von angegebenen Veröffsnäfehunges T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelded oder dem Priorättadatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolijdiert, sondere nur zum Veröffendes des der "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedoutsam enzusenen let "E" Afteree Dokument, das jedoch arat am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeli Theorie angegeben ist Province authorized in a Verriffering of the beautypruchte Erfindung kenn allein aufgrund dieser Veröfferdichung mieht als neu adar auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "L" Veröffantlichung, die geeignet ist, ehen Prioritifeasspruch zwelte sotienen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichtungsdetum anderen im Rischenchenberfoht genannten Veröffentlichtung bete turn olner Veröffentlichting von bes onderer Bedautung; die beansprüchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beschend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mahreren anderes Veröffentlichungen dieser Kalegorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung (ür einen Footmann nehellegend at anderen im Recherchenberfolst genannten Veröffentlichung belegt were soll oder die aus. einem anderen beschderen Grund angegeben ist (wie "O' Verifientiichung, die sich auf eine mündliche Offenberung, eine Benutzung, eine Ausetaßung oder andere Matinahmen bezieht "P' Veriffantlichung, die vor dem internationalen Armeidedelum, ober nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Palentfamilie ist Absendedatum des internetionalen Recherchenberichte 30 10 00 30. Oktober 2000 Name und Postenschrift der Internationaten Recherchenbehörde Europäisches Patentame, P.B. 5818 Patentlean 2 NL - 2280 HV R/swijet Tel. (431-70) 340-2040, Tx, 31 851 epo nl, Fax; (+31-70) 340-3016 Bevolmlichtigter Sedienstele De Kok, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

•	Interr	tales Aktengo iconsil	
	PCT/	'EP 00/08776	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Kabagone* Bezeichnung der Voröffentlichung, soweil erforderlich unter Angebe der in Betrocht kommen A J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US	den Toks	Betr. Anapruoh Nr.
A J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768	den Tolle	
structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, 8d. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768		1
in der Anmeldung erwähnt Seite 286		
ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB. OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, 8d. 24. Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz		1,2,4,7, 9-11,13, 17
WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21. Juli 1994 (1994-07-21) Anspruch 10		1,18

PCT/EP 89/89776

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Feld! Bemenungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Bla
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus (olgenden Gründen für bostimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
weil als eich auf Gegenstände beziehen, zu doren Recherche die Behörde nicht vorpflichtet ist, nämlich
2. X Ansprüche Nr. 16 20 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschristenen Anforderungen so wereg entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. weil es sich dobei um abhängige Ansprüche handolt, die rücht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feid II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat fostgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
siehe Zusatzblatt
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt zich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
De für alle recherchierozzen Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtlertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solichen Gebühr aufgefordent.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recharchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recharchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Rocherchengebühren recht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenden der Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zehlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 218

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 16 20

Die geltenden Patentansprüche 16 und 20 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, von denen keiner als im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung gestützt und/oder als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht entsprechend gestützt und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher würden diese Ansprüche nicht recherchiert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Irs. dionales Aktenzeichen
PCT/EP 00/00776

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentamitie		Datum der Veröffentlichung	
EP (0943679	A	22-09-1999	AU WO	3411999 A 9947652 A	11-10-1999 23-09-1999
WO S	9913080	A	18-03-1999	AU Ep	9391598 A 1012285 A	29-03-1999 28-06-2000
WO 9	9415561	Α	21-07-1994	AU AU DE EP JP	694092 B 3469993 A 69325721 D 0679076 A 8507702 T	16-07-1998 15-08-1994 26-08-1999 02-11-1995 20-08-1996